Lehmann, F. E. 1951. *Der Kernapparat tierischer Zellen und seine Erforschung mit Hilfe von Antimitotica.* Schweiz. Z. Allgem. Path. & Bakteriol. 14: 487.

Lehmann, F. E. & Bretscher, A. 1951. *Antimitotische und entwicklungshemmende Stoffwirkungen auf den Seeigelkeim.* Arch. Jul. Klaus-Stiftg. 26: 459.

— 1952. *Wirkungsanalyse regenerationshemmender Stoffe mit Hilfe statistischer Methoden.* Helv. Physiol. Acta 10: 20.

Lehmann, F. E. & Dettelbach, H. R. 1952. *Histostatische Wirkungen von Aminoketonen auf die Schwanzregeneration der Xenopuslarve.* Rev. Suisse Zool. 59: 253.

Lettré, H. 1953. *Zur Frage einer tumorhemmenden Wirkung des Glucosamins.* Naturw. 40: 513.

Lüscher, M. 1946. *Die Wirkung des Colchicins auf die an der Regeneration beteiligten Gewebe im Schwanz der Xenopus-Larve.* Rev. Suisse Zool. 53: 683.

— 1946. *Die Hemmung der Regeneration durch Colchicin beim Schwanz der Xenopus-Larve und ihre entwicklungsphysiologische Wirkungsanalyse.* Helv. Physiol. Acta 4: 465.

Morgan, J. F. & Parker, R. C. 1952. *Interrelationships between cobalt and amino acids in tissue culture.* Arch. Biochem. Biophysics 38: 267.

Quastel, H. & Cantero, A. 1953. *Inhibition of tumour growth by D-Glucosamine.* Nature 171: 252.

Suter, M. 1950. *Über Aminoalkohole.* Diss. philos. Fak. II, Univ. Zürich.

Weber, R. & Lehmann, F. E. 1952. *Die regenerationshemmende Wirkung von Aminoketonen in Abhängigkeit vom Lösungsmittel.* Verh. Schweiz. Naturf. Ges. 158.

N° 20. **P. S. Chen und E. Hadorn,** Zürich. — Vergleichende Untersuchungen über die freien Aminosäuren in der larvalen Haemolymphe von *Drosophila*, *Ephestia* und *Corethra*. (Mit 2 Textabbildungen und 3 Tabellen.)

Zoologisch-vergl. anatomisches Institut der Universität Zürich. Ausgeführt und herausgegeben mit Unterstützung der Georges und Antoine Claraz-Schenkung.

1. *Problemstellung.* — In neueren Untersuchungen über die biochemische Auswirkung von Mutationen bei *Drosophila* (Hadorn

und MITCHELL 1951, HADORN und STUMM-ZOLLINGER 1953) und bei *Ephestia* (HADORN und KÜHN 1953) zeigte sich die Notwendigkeit, das Stoffinventar der nicht-mutierten Wildform möglichst genau aufzunehmen. Die vorliegende Arbeit soll zunächst feststellen, welche freien Aminosäuren, Amide und Peptide in der larvalen Hämolymphe von *Drosophila melanogaster*, *Ephestia kühniella* und *Corethra plumicornis* vorkommen. Dass ausser den beiden „genetischen Objekten" auch noch *Corethra* untersucht wurde, geschah im Hinblick auf die mögliche Bedeutung der Bluteigenschaften für den Farbwechsel (vgl. HADORN und FRIZZI 1949). Wir bestimmten sowohl die Gesamtmenge der erwähnten Ninhydrin-positiven Stoffe, wie auch die Quantität der verschiedenen Einzelverbindungen bei den drei Arten vergleichend. Die Untersuchungen sollen als Grundlage dienen für spätere Studien über Änderungen der Blutzusammensetzung in der normalen Entwicklung. Vor allem aber dürften die Ergebnisse für die Beurteilung der „biochemischen Pleiotropie-Wirkung" (HADORN 1954) von Erbfaktoren unentbehrlich sein.

2. *Material und Methode.* — Die von uns angewendete papierchromatographische Methode zur Trennung und Bestimmung von Aminosäuren, Peptiden und Amiden wurde bereits von HADORN und STUMM-ZOLLINGER (1953) und STUMM-ZOLLINGER (1954) eingehend beschrieben. Es folgen hier nur einige ergänzende Bemerkungen über die Herkunft des Materials und über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchsanordnungen.

Bei *Corethra* und *Ephestia* wurden die Untersuchungen ausschliesslich an ausgewachsenen Larven ausgeführt. Die *Corethra*-Larven wurden während des Winters 1953 im Zürichsee gefangen. Zur Analyse der Aminosäuren verwendeten wir nur frisch gefangene Tiere. Die *Ephestia*-Larven stammten aus einem Wildstamm, der im Max-Planck-Institut für experimentelle Biologie, Tübingen, gezüchtet wird und uns von Prof. Dr. A. KÜHN zur Verfügung gestellt wurde. Bei beiden Arten untersuchten wir ausgewachsene Tiere des letzten Larvenstadiums, doch dürfte das Versuchsmaterial mit einer gewissen Streuung der Entwicklungsstadien belastet sein, da die Larven bei Zimmertemperatur gehalten wurden und wir für *Corethra* die Vorgeschichte der frisch eingefangenen Tiere nicht kennen. Als *Drosophila*-Versuchsmaterial verwendeten

wir einen Wildstamm (Sevelen), der seit vielen Generationen in unserem Institut durch Bruder-Schwester-Kreuzungen gezüchtet wird. Es wurden zweistündige Gelege von jungen Tieren gesammelt. Nach dem Schlüpfen wurden die Larven in gewöhnlichen Zuchtschalen auf Standardfutter (Mais-Zucker-Hefe-Agar) bei 25 ± 1° C gehalten. Wir untersuchten 72-, 84-, 96-, und 120-stündige Larven.

Vor der Entnahme der Hämolymphe wurden die Larven in destilliertem Wasser gründlich gewaschen und mit Filterpapier getrocknet. Die Haut der Larven wurde unter dem Binokular ohne Verletzung des Darmes geöffnet und die herausfliessende Hämolymphe mit einer Mikropipette aufgesogen. Es wurde 20,36 mm^3 Hämolymphe von *Drosophila* resp. *Ephestia* oder 36,2 mm^3 von *Corethra* zum Chromatographieren gebraucht. Das aufgesogene Blut wurde in einem Glasröhrchen mit 40 mm^3 aqua bidestillata verdünnt. Durch kurzes Eintauchen in siedendes Wasser (ca. 15—20 Sekunden) und Abzentrifugierung wurden die Eiweisse entfernt und die überstehende Flüssigkeit auf das Papier (Whatman Nr. 1, 28,6 cm × 46,2 cm) aufgetragen.

Zur Analyse der in der larvalen Hämolymphe befindlichen Aminosäuren und Polypeptide benutzten wir das zweidimensionale papierchromatographische Verfahren. Bei allen Untersuchungen wurden die folgenden Lösungsmittel verwendet: 70%iges n-Propanol (1. Dimension, aufsteigend) und wassergesättigtes Phenol (2. Dimension, absteigend). Das mit Propanol behandelte Papier wurde in der Luft, das mit Phenol behandelte im Wärmeschrank (maximale Temperatur 46° C, ca. 1—1½ Stunden) getrocknet. Nachher wurde das Papier mit einer 0,1%igen Ninhydrinlösung gleichmässig besprüht und während 10—15 Minuten bei 70—90° C gehalten. Nach der Angabe von Boissonnas (1951) und den früheren Erfahrungen in unserem Institut konnten wir die meisten Aminosäuren ohne Schwierigkeit identifizieren. An zweifelhaften Stellen wurden die Flecken entweder durch Zugabe von reinen Substanzen oder durch spezifische Tests kontrolliert, die wir bei der Beschreibung der Einzelergebnisse anführen werden.

Zur quantitativen Bestimmung wurde das Papier leicht mit einer 0,01%igen Ninhydrinlösung besprüht und während 10 Minuten bei 70° C der Entwicklung überlassen. Nach der Markierung der schwach gefärbten Flecken wurden beide Seiten des Papiers mit einer methanolischen Kalilauge (1%) bespritzt und während

20 Minuten bei 60° C erwärmt. Diese Behandlung ist nötig, weil der im Papier adsorbierte Ammoniak ebenfalls eine Ninhydrin-positive Reaktion gibt. Die vorher mit Bleistift umzeichneten Flecken wurden ausgeschnitten, einzeln in ein Reagenzglas gelegt und mit 5 cc der von Boissonnas angegebenen Ninhydrinmischung übergossen. Die Entwicklung der Farbreaktion erfolgte durch Eintauchen in ein siedendes Wasserbad. Nach genau 20 Minuten wurden die Reagenzgläser sofort in kaltes Wasser gestellt und mit je 5 cc einer 50%igen n-Propanollösung verdünnt. Die Messungen der Farblösungen wurden mit einem Spektrophotometer (Beckman, Modell DU) bei 570 μ (für Prolin bei 440 μ) aufgenommen. Die Papierwerte wurden von den Extinktionskoeffizienten abgezogen (vgl. Stumm-Zollinger 1954).

Erfahrungen anderer Autoren (Fewden und Penney 1950; Brush, Boutwell, Barton und Heidelberger 1951) haben gezeigt, dass bei der Verwendung von Phenol als Lösungsmittel das Trocknen bei hoher Temperatur einen Verlust der Aminosäuren zur Folge hat. Diese Tatsache konnten wir durch Eichen der Extinktionswerte mit reinen Substanzen bestätigen. Es wurden verschiedene Mengen von reinen Aminosäuren auf das Papier gebracht. Bei einer Serie wurde das Papier genau wie bei der Blutanalyse in Propanol und Phenol laufen gelassen. Bei der zweiten Serie wurde das Papierstück, das gleichviel Aminosäuren enthielt, nicht mit den Lösungsmitteln behandelt, sondern direkt in das Ninhydrinreagens hineingestellt. Bei allen Konzentrationen zeigten die phenolbehandelten Papierstücke gegenüber den Kontrollen einen Verlust der Aminosäuren. Für verschiedene Aminosäuren und für Glutamin hat Stumm-Zollinger (1954) die Verluste berechnet. Wir verwendeten hier ihre Korrekturwerte. Ergänzend bestimmten wir die Eichkurven für weitere Aminosäuren. Sie sind in Abbildung 1 dargestellt. Überall besteht Linearität zwischen Konzentration und Extinktion und zwar sowohl für die Kontrollkurve wie auch für die den Phenolverlust anzeigende Kurve. Im übrigen sind die Verluste je nach Aminosäure verschieden: Gross z. B. bei Lysin und Cystin, sehr klein bei Glutaminsäure und Prolin.

Zur Bestimmung der Gesamtmenge der Ninhydrin-positiven Substanzen in der Hämolymphe erwies sich die von Hadorn und Stumm-Zollinger (1953) benutzte Methode als besonders ge-

eignet. Es wurde je 2,58 mm³ Hämolymphe ohne Entfernung der Eiweisse auf das Papier (16,1 × 22,8 cm) gebracht und in n-Propanol (70%) eindimensional laufen gelassen. In einer Kontrollserie konnte gezeigt werden, dass das Eiweiss auf dem Startflecken stehen bleibt und daher die Messungen der Totalmenge der gewanderten Ninhydrin-positiven Substanzen nicht beeinflusst (die Papier-

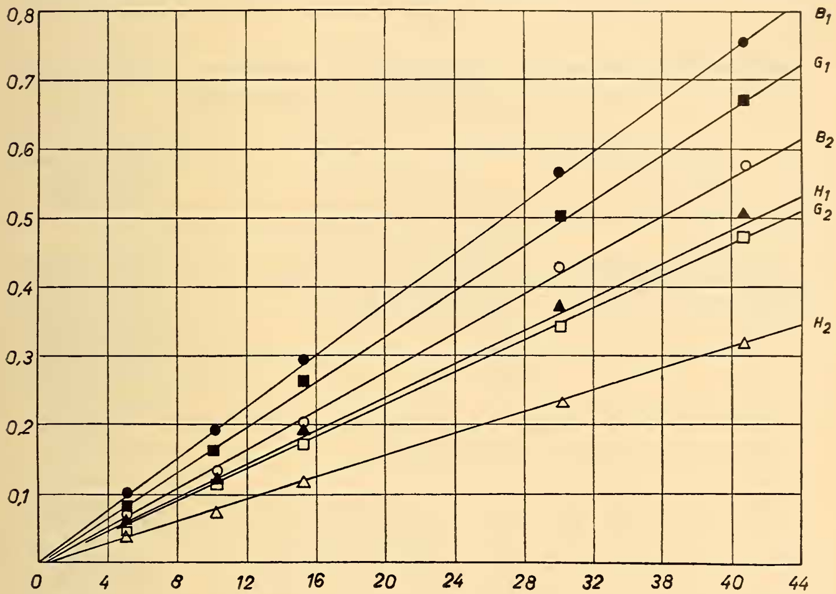


Abb. 1.

Eichkurven für β-Alanin (B), γ-Aminobuttersäure (G) und Histidin (H). B_1, G_1 und H_1: direkte Bestimmung ohne Chromatographie. B_2, G_2, H_2: Bestimmung gleicher Mengen nach Chromatographie mit Propanol und Phenol. Ordinate: Extinktionswerte bei 570 mμ. Abszisse: Substanzmenge in γ.

flecken wurden ohne Startflecken ausgeschnitten). Die Farbreaktionen sowie die Messungen der Extinktionskoeffizienten wurden gleich durchgeführt wie bei den zweidimensionalen Chromatogrammen.

3. *Vergleich der Gesamtkonzentrationen an Ninhydrin-positiven Substanzen.* — Die Mittelwerte sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass bei *Corethra* die larvale Hämolymphe wesentlich schwächer konzentriert ist als bei den zwei

anderen Larventypen. Die *Ephestia*- und die jungen *Drosophila*-Larven (72-84 Stunden nach Eiablage) sind annähernd gleich reich an Ninhydrin-positiven Substanzen. Bei *Ephestia* wurden ausschliesslich verpuppungsreife Larven als Versuchsmaterial verwendet. Nach unseren Erfahrungen an *Drosophila* wäre bei jüngeren *Ephestia*-Larven eine höhere Konzentration zu erwarten.

Tabelle 1.

Totalkonzentration an Ninhydrin-positiven Stoffen in der Hämolymphe von *Corethra*, *Ephestia* und *Drosophila*.

Insektenarten	Entwicklungsalter	*n* [1]	Extinktion pro 2,58 mm³ Hämolymphe
Corethra pulmicornis	Ausgewachsene Larven	9	0,301 ± 0,010
Ephestia kühniella	Verpuppungsreife Larven	10	0,538 ± 0,023
Drosophila melanogaster	72 h nach Eiablage	6	0,595 ± 0,019
» »	84 h » »	5	0,552 ± 0,027
» »	96 h » »	7	0,410 ± 0,020
» »	120 h » »	12	0,404 ± 0,026

[1] Zahl der ausgeführten Einzel-Messungen.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, nimmt bei *Drosophila* die Konzentration während der Larvalentwicklung ständig ab. Damit wurde eine Feststellung von Hadorn und Stumm-Zollinger (1953)im wesentlichen bestätigt. Bei 120-stündigen Larven zeigen unsere Messungen allerdings einen höheren Durchschnittswert. Dieser Unterschied beruht wohl auf einer Streuung im physiologischen Alter der Larven. Normalerweise verpuppen sich die *Drosophila*-Larven bei 25° C im Alter von 96-100 Stunden. Es kommen aber sehr oft Tiere vor, deren Larvalentwicklung bis 120 Stunden dauert. Während der abnormen Verzögerung des Verpuppungsvorganges wird die Blutkonzentration weiter herabgesetzt. Dadurch kann das ältere Material in verschiedenen Zuchten uneinheitlich werden.

4. *Das Inventar der Ninhydrin-positiven Stoffe.* — Die von uns festgestellten Aminosäuren, Amide und Polypeptide sind in Tabelle 2 und Abbildung 2 angegeben. Die Hämolymphe der

Corethra-Larven unterscheidet sich von *Ephestia* und *Drosophila* durch das vollständige Fehlen des Prolins; ausserdem ist nur ein Peptid (3) vorhanden. *Ephestia* und *Drosophila* enthalten die gleichen Aminosäuren. Sie unterscheiden sich aber in den Peptiden.

Für die einzelnen Stoffe sind folgende Befunde bemerkenswert: Es konnte bei allen untersuchten Arten γ-Aminobuttersäure nachgewiesen werden. Mit Hilfe der papierchromatographischen Methode wurde dieser Stoff in verschiedenen Organismen gefunden (für Literaturangaben siehe Lederer und Lederer S. 211, 1953). Wir haben den betreffenden Fleck durch Zugabe von reiner Substanz kontrolliert. Es wurde ferner mit dem von Crumpler und Dent (1949) angegebenen, für γ-Aminosäure spezifischen Test geprüft: Bevor wir das Chromatogramm ins

Tabelle 2.

Vergleich der freien Aminosäuren, Amide und Polypeptide in der Hämolymphe von *Corethra*, *Ephestia* und *Drosophila*.

Stoffe	*Corethra pulmicornis*	*Ephestia kühniella*	*Drosophila melanogaster* 72 h	*Drosophila melanogaster* 96 h
α-Alanin	+	+	+	+
β-Alanin	+	+	+	+
γ-Aminobuttersäure	+	+	+	+
Arginin	+	+	+	? [1]
Asparaginsäure	+	+	+	+
Glutamin	+	+	+	+
Glutaminsäure	+	+	+	+
Glycin	+	+	+	+
Histidin	+	+	+	+
Leucin/Isoleucin	+	+	+	+
Lysin	+	+	+	+
Methionin	(+)	+	+	+
Prolin	—	+	+	+
Serin	+	+	+	+
Threonin	+	+	+	+
Tyrosin	+	+	+	+
Valin	+	+	+	+
Peptid 1	—	?	+	+
Peptid 2	—	?	+	+
Peptid 3	+	—	+	+
Peptid 4	—	—	+	?
Peptid 5	—	+	—	—

[1] „?" bedeutet, dass die betreffende Substanz höhestens spurenweise vorkommt.

Phenol einlegten, wurden die Stellen des Papiers, in welche die Stoffe der Hämolymphe einwandern werden, mit basischem Kupfercarbonat-Pulver bestäubt. Mit dem Phenol wandern alle Aminosäuren in den bestäubten Bereich ein. Anschliessend wird n-Propanol als Lösungsmittel verwendet. Jetzt bleiben die α-Aminosäuren, die einen Komplex mit Kupfer bilden, an Ort und Stelle, während γ-Aminobuttersäure ungestört weiter wandert. Diese färbt sich violett mit Ninhydrin und erscheint als einziger sichtbarer Fleck auf dem Test-Chromatogramm. γ-Aminobuttersäure könnte mit Methionin-Sulfoxyd, das die gleichen Rf-Werte in beiden Richtungen zeigt, verwechselt werden. Nach dem oben angegebenen spezifischen Test verhält sich diese Substanz jedoch ganz anders als γ-Aminobuttersäure. Sie zeigt nach der Kupfercarbonat-Behandlung im Propanol keine Wanderung.

In der Hämolymphe konnten wir Cystin nie mit genügender Sicherheit feststellen. Hingegen trat diese Substanz beim Chromatographieren ganzer Larven auf dem Papier regelmässig auf (13 Bestimmungen). Offenbar ist das Cystin stark an das Gewebe gebunden.

Das Peptid 3 wurde einzig in der *Corethra*-Hämolymphe nachgewiesen. Es liegt unmittelbar unter Glycin (Abb. 2) und bildet mit Ninhydrin eine braungelbe Farbe. Wir haben diesen Fleck ausgeschnitten und im Wasser eluiert. Die Hydrolyse des Eluates mit Salzsäure zeigte, dass in diesem Peptid mindestens Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin und Glycin enthalten sind, wobei Asparaginsäure in besonders hoher Konzentration.

Das Peptid 5 wurde nur im *Ephestia*-Blut gefunden. Es liegt zwischen Glycin und Glutamin (Abb. 2) und lässt sich meistens nicht deutlich von Glycin trennen. Die folgenden Aminosäuren wurden im Hydrolysat festgestellt: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Glycin und Tyrosin.

Über die freien Aminosäuren der *Drosophila*-Hämolymphe liegen bereits Angaben von AUCLAIR und DUBREUIL (1951) vor. Bestimmungen von NAKAMURA et al. (1953) an *Drosophila virilis* sind mit unseren Ergebnissen nicht vergleichbar, da die japanischen Autoren mit Extrakten aus ganzen Tieren arbeiteten. Das von AUCLAIR und DUBREUIL gemeldete Vorkommen von Asparagin und Oxyprolin konnten wir nicht bestätigen. Dagegen fanden wir in deutlichen Konzentrationen β-Alanin, Histidin und γ-Amino-

buttersäure; diese Stoffe wurden von Auclair und Dubreuil nicht registriert. Rf-Werte und charakteristische Farbreaktionen kennzeichnen die drei Aminosäuren. β-Alanin bildet eine blaue Farbe, während Histidin sich braunrot färbt. γ-Aminobuttersäure wurde nach dem oben geschilderten Verfahren mehrmals kontrolliert. Da diese Aminosäure auch in der Hefe vorkommt, fragten

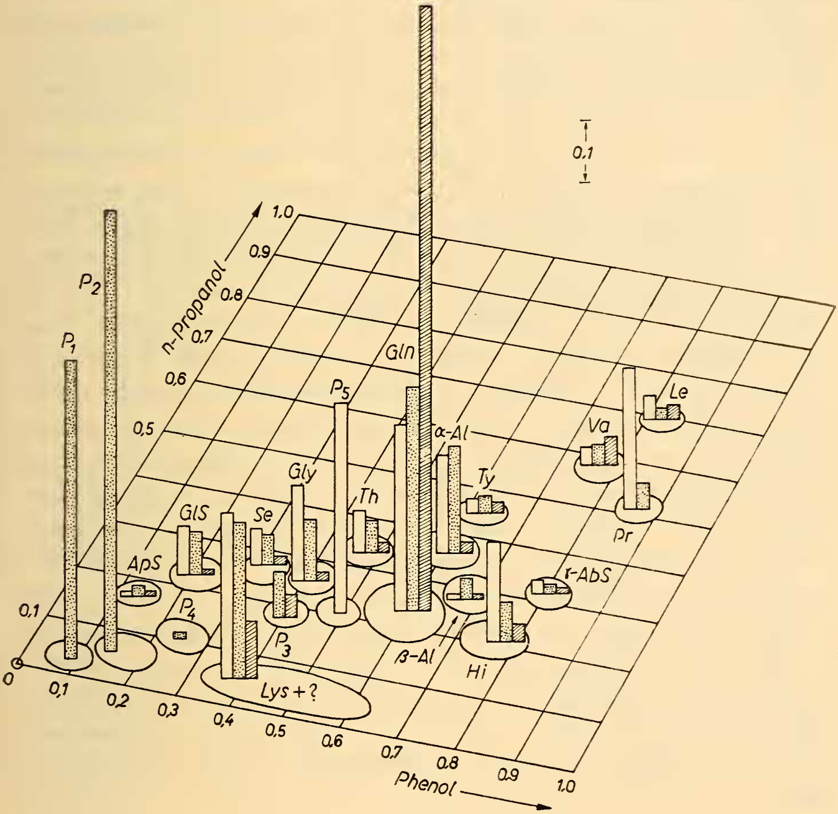


Abb. 2.

Graphische Darstellung der Extinktionswerte (Höhe der Säulen) der Ninhydrin-positiven Stoffe in je 20,63 mm³ Larvenhämolymphe von *Ephestia* (leere Säulen), *Drosophila*, 96 h (punktiert) und *Corethra* (schraffiert). Die Rf-Werte der Flecken sind im zweidimensionalen Chromatogramm angegeben. P_1 — P_5 Polypeptide, Lys + ? Lysin mit Arginin (?), ApS Asparaginsäure, GlS Glutaminsäure, Se Serin, Gly Glycin, Th Threonin, Gln Glutamin, α-Al α-Alanin, β-Al β-Alanin, Ty Tyrosin, Hi Histidin, γ-AbS γ-Aminobuttersäure, Pr Prolin, Va Valin, Le Leucin (Isoleucin). Methionin wäre bei diesem Verfahren nicht deutlich nachweisbar. Oben rechts: Masstab für Höhe der Säulen in Extinktionseinheiten (0,1).

wir uns, ob nicht der Inhalt des Larvendarmes für das Auftreten dieser Substanz auf dem Chromatogramm verantwortlich sein könnte. Wir haben aber beim Aufsaugen der Hämolymphe besonders darauf geachtet, dass der Darm nicht verletzt wurde und überdies fanden wir diese Aminosäure nicht nur in Drosophila, sondern auch in *Corethra* und *Ephestia*, wo der Darminhalt sicher keine Hefe enthält.

Bei den von uns angewandten Lösungsmitteln lassen sich Arginin und Lysin nicht deutlich trennen. Sie zeigen Schwanzbildungen und bilden oft mehr als zwei Flecken. Durch Zugabe von Ammoniak zum Phenol (0,3%) wurde die Schwanzbildung verhindert. Die beiden Aminosäuren zeigen nun eine grosse Wanderungsgeschwindigkeit und bilden zusammen einen scharfen Fleck. Wir haben diesen, mit Ninhydrin schwach markierten Fleck ausgeschnitten und eluiert. Der eingedickte Extrakt wurde in einem Gemisch von Pyridin, Eisessig und Wasser (50: 35: 15) eindimensional chromatographiert. Dabei wurde festgestellt, dass Lysin vorherrscht. Arginin kommt nur in sehr geringer Menge vor.

Es sind vier Peptide in der *Drosophila*-Hämolymphe nachgewiesen. Die Peptide 1 und 2, die von HADORN und MITCHELL (1951) als „Larvin" bezeichnet wurden, treten in allen untersuchten Entwicklungsstadien auf. Sie lassen sich jedoch bei verpuppungsreifen Larven deutlicher voneinander trennen als bei jüngeren Larven. Das Ergebnis der Hydrolyse bewies, dass sie mindestens Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Glycin, Tyrosin und α-Alanin enthalten. Das Peptid 3 kommt bei *Drosophila* ebenfalls in allen Entwicklungsstadien vor. Das Peptid 4 wurde hauptsächlich bei 72-stündigen Larven gefunden und befindet sich dicht unter der Glutaminsäure (Abb. 2). Im Hydrolysat liessen sich vier Aminosäuren nachweisen: Glutaminsäure, Serin, Glycin und Valin.

5. *Quantitative Bestimmungen der einzelnen Aminosäuren und Peptide.* — In Abbildung 2 sind die Konzentrationen aller untersuchten Stoffe in Extinktionswerten pro Volumeneinheiten graphisch dargestellt. Bei der quantitativen Analyse der Ninhydrinpositiven Substanzen müssen aber zwei Fehlerquellen berücksichtigt werden. Erstens sind die Aminosäuren nicht gleich empfindlich gegen die Ninhydrinreaktion (siehe S. 440). Zweitens

hat das Trocknen des mit Phenol behandelten Chromatogrammes einen Substanzverlust zur Folge. Es wurde von uns festgestellt, dass diese Verluste bei verschiedenen Aminosäuren verschieden sind (vgl. Stumm-Zollinger, 1954) und Abb. 1 der vorliegenden Arbeit). Wir geben zusätzlich in Tabelle 3 die korrigierten Mengen der einzelnen Stoffe pro Volumeneinheit Hämolymphe an. Für β-Alanin, γ-Aminobuttersäure und Histidin wurden die von uns bestimmten Eichkurven verwendet. Für die übrigen Aminosäuren benutzten wir die von Stumm-Zollinger ausgearbeiteten Gleichungen. Die angegebenen Werte können nicht mehr als eine erste

Tabelle 3.

Konzentration der freien Aminosäuren, Amide und Polypeptide in der Hämolymphe von *Corethra*, *Ephestia* und *Drosophila*.

Stoffe	*Corethra pulmicornis*		*Ephestia kühniella*		*Drosophila melanogaster* 72 h		*Drosophila melanogaster* 96 h	
	n [1]	γ/10 mm³	*n*	γ/10 mm³	*n*	γ/10 mm³	*n*	γ/10 mm³
Leucin-Isoleucin .	4	2,4	5	4,2	3	4,4	2	3,1
Valin	4	2,9	4	3,1	4	4,0	3	3,1
Histidin	4	2,0	6	10,7	4	10,3	4	4,1
α-Alanin	4	1,0	6	4,8	5	18,5	4	5,2
Glutamin	4	44,4	6	14,0	4	34,8	7	17,6
Threonin	4	1,5	6	4,1	4	6,8	4	3,6
Serin	3	0,8	5	2,5	3	8,0	4	2,2
Glycin	4	0,6	8	3,7	3	4,7	4	2,5
Lysin + Arginin (?)	4	8,0	2	24,0	3	30,5	3	19,5
Tyrosin	4	3,5	4	4,4	3	4,4	6	5,0
Prolin		—	6	91,7	5	11,7	8	17,8
Peptid 1		—		—	4	(0,337) [2]	3	(0,492)
Peptid 2		—		—	4	(0,518)	3	(0,721)
Peptid 3	3	(0,037)		—	3	(0,154)	4	(0,076)
Peptid 4		—		—	4	(0,290)		—
Peptid 5		—	8	(0,343)		—		—

[1] Zahl der Einzel-Messungen.
[2] Da die Zusammensetzung der Peptide nicht bekannt ist, geben die eingeklammerten Werte die „Quantität" in Extinktionswerte pro 20,36 mm³ an.

vergleichende Orientierung geben. Exakte quantitative Angaben verlangten zahlreichere Einzelbestimmungen; erst dann liessen sich allfällige methodische Fehler mit genügender Sicherheit ausschliessen oder berücksichtigen.

Das *Corethra*-Blut zeichnet sich durch seinen hohen Gehalt an Glutamin aus. Nach unseren Messungen macht dieser Stoff ca. 70% der Gesamtmenge aus. Die Untersuchungen an *Galleria mellonella* ergaben, dass dort Glutamin ebenfalls am stärksten vertretenen ist (AUCLAIR und DUBREUIL 1952). Unseres Wissens ist dieses Amid bei den meisten bisher untersuchten Insekten nachgewiesen worden. Wahrscheinlich spielt es im Eiweisstoffwechsel und für die Entgiftung von Ammoniak eine wichtige Rolle (AUCLAIR und DUBREUIL 1953; WEIL-MALHERBE 1953).

Die *Ephestia*-Hämolymphe enthält mindestens fünfmal mehr Prolin als das *Drosophila*-Blut. Da das Prolin für die meisten Insekten als entbehrliche Aminosäure gilt, ergeben sich vorläufig keine Hinweise für die Deutung dieses Befundes.

Bei der Untersuchung der Gesamtmenge an Ninhydrin-positiven Stoffen in der Hämolymphe wurde bereits festgestellt (Tab. 1), dass die Konzentration im Verlaufe der Larvalentwicklung absinkt. Wir fragen nun, ob die verschiedenen Stoffe sich gleichmässig vermindern, oder ob einzelne Stoffe vorkommen, deren Menge konstant bleibt. Die Klärung dieser in der normalen Ontogenese ablaufenden Vorgänge wird für die Beurteilung von Erbfaktor-Wirkungen notwendig, da STUMM-ZOLLINGER (1954) bei der Analyse der letalen Mutante „*translucida*“ feststellte, dass der Letalfaktor die Menge verschiedener Ninhydrin-positiven Stoffe ungleichmässig beeinflusst. Die Messungen an 72- und 96-stündigen *Drosophila*-Larven zeigen, dass die meisten Aminosäuren erwartungsgemäss abnehmen. Tyrosin und möglicherweise auch Leucin und Valin nehmen aber nicht ab (Tab. 3). Auch für die Peptide ergeben sich unterschiedliche Konzentrationsänderungen in der Entwicklung. Das Peptid 3 nimmt sicher ab, während die Peptide 1 und 2 wahrscheinlich zunehmen. Andererseits verschwindet das Peptid 4, das bei 72-stündigen Larven einen deutlichen Fleck bildet, fast vollständig bei 120-stündigen Larven.

Es ist bekannt, dass für die normale Metamorphose der Insekten gewisse Aminosäuren unentbehrlich sind (LEMONDE und BERNARD 1951). Solche Substanzen werden für den Aufbau des Zellmaterials und gleichzeitig als Energielieferanten gebraucht. Ihr Verschwinden aus der Hämolymphe ist deshalb verständlich. Andererseits erfolgt in der Metamorphose ein Abbau der larvalen Organe. Dadurch können gewisse Stoffe vermehrt frei werden. Die Tatsache, dass

in der Hämolymphe das Inventar der frei vorkommenden Aminosäuren und Polypeptide je nach der Entwicklungsstufe qualitativ und quantitativ verschieden ist, wurde auch an *Calliphora* (Agrell 1949) nachgewiesen. Für das Verständnis der normalen Entwicklung, sowie für die Deutung der entwicklungsphysiologischen Auswirkung von Mutationen dürften solche Befunde von besonderer Bedeutung sein.

Summary

1. The method of paper partition chromatography was used to study qualitatively and quantitatively the free amino acids and peptides in the larval hemolymph of *Corethra pulmicornis*, *Ephestia kühniella* and *Drosophila melanogaster*.

2. It was found that the total concentration of ninhydrin-positive substances is the lowest in *Corethra*. *Ephestia* and *Drosophila* have about the same concentration. The measurements on *Drosophila* larvae aged 72, 84, 96 and 120 hours after egg-laying (at 25° C) showed a steady decrease of the blood concentration.

3. The following substances have been identified in the larval hemolymph of all three insects: leucine, valine, histidine, α-alanine, β-alanine, glutamine, threonine, serine, glycine, lysine, γ-aminobutyric acid, aspartic acid, glutamic acid, tyrosine and methionine. Proline occurs in *Ephestia* and *Drosophila*, but was not detected in *Corethra*. Besides, there have been found five different peptides which are characteristic either for one or the other of the three species studied.

4. The quantitative determinations showed that *Corethra* has an extremely high glutamine concentration. This amide amounts to ca. 70% of the total quantity of ninhydrin-positive substances in the larval hemolymph. In *Ephestia* blood the concentration of proline is at least five times higher than in *Drosophila*. Further, the analysis of *Drosophila* larvae aged 72 and 96 -hours indicates that there is a change in concentration of most of the ninhydrin-positive materials during the late larval development. The contents of the majority of amino acids fall off while others either maintain the same concentration or even rise slightly. The change of concentration apparently varies with each amino acid.

BIBLIOGRAPHIE

AGRELL, J. 1948. *Occurence and metabolism of free amino acids during insect metamorphosis.* Acta Phys. Scand. 18: 247.

AUCLAIR, J. L. and R. DUBREUIL. 1952. *A simple ultramicromethod for the qualitative estimation of amino acids by paper partition chromatography.* Canad. J. Zool. 30: 109.

— 1953. *Etude sur les acides aminés libres de l'hémolymphe des insectes par la méthode de chromatographie sur papier filtre.* Canad. J. Zool. 31: 30.

BOISSONNAS, R. A. 1950. *Dosage colorimétrique des acides aminés séparés par chromatographie sur papier.* Helv. chim. Acta 33: 1975.

BRUSH, M. K., R. K. BOUTAVELL, A. D. BARTON and C. HEIDELBERGER. 1951. *Destruction of amino acids during filter paper chromatography.* Sci. 113: 2923.

CRUMPLER, H. R. and C. E. DENT. 1949. *Distinctive test for alpha-amino acids by paper partition chromatography.* Nature 164: 441.

FOWDEN, L. and J. R. PENNEY. 1950. *Elimination of losses in quantitative estimation of amino acid by paper chromatography.* Nature 165: 846.

HADORN, E. 1954. *Approaches to the studies of biochemical and developmental effects of mutations.* Proc. IX. int. Congress Genetics (im Druck).

HADORN, E. und G. FRIZZI. 1949. *Experimentelle Untersuchungen zur Melanophoren-Reaktion von Corethra.* Rev. suisse Zool. 56: 306.

HADORN, E. and A. KÜHN. 1953. *Chromatographische und fluorometrische Untersuchungen zur biochemischen Polyphänie von Augenfarb-Genen bei Ephestia kühniella.* Z. Naturforschung 86: 582.

HADORN, E. and H. K. MITCHELL. 1951. *Properties of mutants of Drosophila melanogaster and changes during development as revealed by paper chromatography.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 37: 650.

HADORN, E. und E. STUMM-ZOLLINGER. 1953. *Untersuchungen zur biochemischen Auswirkung der Mutation „letal-translucida" (ltr) von Drosophila melanogaster.* Rev. suisse Zool. 60: 506.

LEDERER, E. and M. LEDERER. 1953. *Chromatography.* Elsevier, Amsterdam.

LEMONDE, A. et R. BERNARD, 1951. *Nutrition des larves de Tribolium confusum Duval II. Importance des acides aminés.* Canad. J. Zool. 29: 80.

Nakamura, K., Y. Kitazume, M. Takanami and T. Imaizumi. 1951. *Free amino acids in different developmental stages and constituent amino acids of eggs of Drosophila.* Pap. Coord. Commit. Res. Genet. 2: 163.

Reed, L. J. 1950. *The occurence of γ-aminobutric acid in yeast extract; its isolation and identification.* The J. of Biol. Chemistry 183: 451.

Stumm-Zollinger, E. 1954. *Vergleichende Analyse der Aminosäuren und Peptide in der Hämolymphe des Wildtypus und der Mutante „letal-translucida" (ltr) von Drosophila melanogaster.* Z. Vererbungslehre 86: 126.

Weil-Malherbe, H. 1953. *Die Funktion der Glutaminsäure im Nervengewebe.* Naturw. Jg. 40: 545.

N° 21. **Heinrich Müller,** Biel. — Zur Fortpflanzungsbiologie des Hermelins *(Mustela erminea L.).*

Die Feststellung einer verlängerten Tragzeit bei verschiedenen Marderarten hat dazu geführt, dass auch die Fortpflanzungsdaten anderer Musteliden überprüft wurden. Beim Hermelin ergaben mikroskopische Untersuchungen Watzkas (1940) an einem umfangreichen Material, dass die Ovarien zweimal im Jahr, im März und dann wieder im Juni, „reife Bläschenfollikel und frische Gelbkörper" aufweisen, während die Hoden sich gegen den Sommer hin bereits in Rückbildung befinden, aber noch befruchtungsfähige Spermien enthalten.

Es besteht somit die Möglichkeit, dass Hermelinfähen zu zwei verschiedenen Zeiten belegt werden können. Da die Geburt der Jungen aber immer in den Zeitraum von April bis Juni fallen soll, wären zwei verschiedene Tragzeiten anzunehmen: nach der Frühlingspaarung die „normale" von za. 10 Wochen, nach der Sommerpaarung dagegen eine durch eingeschaltete Keimruhe auf 9—10 Monate verlängerte. In Übereinstimmung mit dieser Annahme stehen Beobachtungen, z.T. von Liebhabern, dass im Sommer eingefangene und einwandfrei isoliert gehaltene Fähen im darauffolgenden Frühjahr Junge zur Welt brachten.